The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	重症筋無力症患者における胸腺リンパ球サブセットの解析
Author(s)	早川, 正宣
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3052224
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

①

主論文

（題名）

重症筋無力症患者における胸腺リンパ球サブセットの解析

Analysis of thymic lymphocyte subsets in patients with myasthenia gravis.

大阪大学医学部第一外科

First Department of Surgery

Osaka University Medical School

早川正宣

Masanobu Hayakawa

（主任: 川島康生教授）

Key words:Myasthenia gravis, thymus, anti-acetylcholine receptor antibody, Tcell

抄録

18名の重症筋無力症（ＭＧ）患者と11名の対照患者において胸腺リンパ球の表面抗原を2ｶﾗｰﾌﾛｰｻｲﾄﾒﾄﾘｰで解析した。正常例では、CD4+CD8+のdouble positive cellの割合と年齢は負の相関（r=-0.89,p<0.05)を示した。ＭＧ例では両者に有意な相関はなかった。血清抗アセチルコリンレセプター（AchR）抗体価と胸腺内リンパ球のdouble positive cellの割合との間に負の相関（r=-0.52,p<0.05）が、CD4+single positive cellの割合との間に正相関(r=0.56,p<0.05)があったが、CD8+ single positive cellの割合との間には有意の相関はなかった。血清抗AchR抗体価の高い患者胸腺内で増加しているhelper T cellが胸腺での抗AchR抗体産生に関与している事が示唆された。

Analysis of Thymic Lymphocyte Subsets in Patients with Myasthenia Gravis

Two color flowcytometry was used to analyse the thymic lymphocyte subpopulation in 18 patients with myasthenia gravis and 11 normal controls.

In the normal thymus, the proportion of CD4+CD8+ (double positive) cells correlated significantly with the patient age ($r = -0.89$, $p < 0.05$). However, the proportion of double positive cells in the myasthenic thymus did not correlate with the age of the patient. The serum level of anti-acetylcholine receptor (AchR) antibody of the patient correlated significantly with the proportion of double positive cells ($r = -0.52$, $p < 0.05$). The antibody titer also correlated with the proportion of CD4+CD8- cells ($r = 0.56$, $p < 0.05$) and CD45RA+CD3+cells ($r = 0.51$, $p < 0.05$), but not with the proportion of CD4-CD8+.

The increased proportion of helper T cells may be responsible for the anti-AchR antibody production in MG thymus.

緒言

重症筋無力症（ＭＧ）は骨格筋のニコチン作動性アセチルコリン受容体(AchR)に対する抗体によって引き起こされる自己免疫疾患である(1,2)が、その発症のメカニズムは解明されていない。しかし、胸腺摘出によって約80%で5年以内に症状の改善が得られること（1,3,4)、および、ＭＧ患者胸腺の約80%に胚中心の形成が観察され、約30%に胸腺腫を合併する（1,2）といった胸腺異常が多発することから、ＭＧの発生に胸腺が関与している可能性が示唆されてきた。

正常では、自己抗原に反応するＴ細胞は、胸腺内で除去されるが、ＭＧにおいては血清抗AChR抗体が存在することから、自己AchRに反応するリンパ球が存在することが明らかである（1,2)。ＭＧに胸腺の異常が高率に合併することから、胸腺における異常は自己反応性のＴ細胞を除去するという機能に関連している可能性が高いと考えられる。

ＭＧにおける胸腺の研究により、ＭＧ胸腺リンパ球により抗AChR抗体が産生されることが明らかになった(5-8)。ＭＧ胸腺におけるリンパ球サブセットの分布に関しては現在まで種々のマーカーを用いて解析されてきたが、(9-11)、胸腺内リンパ球のサブセットと、血清AChR抗体価との関係についてはまだ明らかにされていない。

本研究は、２カラーフローサイトメトリーを用いて胸腺リンパ球の細胞表面抗原を解析することにより、ＭＧ患者の胸腺内リンパ球サブセットの分布を明らかにし、さらにリンパ球サブセットと血清抗AChR抗体価との関係を検討することを目的とした。

研究方法

1.研究対象

重症筋無力症（ＭＧ）患者18名を対象とした（表１）。年齢は、12歳から54歳、平均35歳であった。この内、6名は胸腺腫を合併していた。全員骨格筋の易疲労性を示し、筋電図異常と、抗コリンエステラーゼ剤の有効性から重症筋無力症と診断した。抗AChR抗体価は、0.2nMから194nMと広い範囲に分布した。胸腺腫合併、非合併により抗体価に有意差はなかった。また抗体価とOssermann病期分類の間には一定の関係はなかった。胸腺腫は症例１３の一例（上皮細胞優位）を除きリンパ球、上皮細胞の混合型であった。他臓器に浸潤したものはなかった。

全症例で、術前ステロイドホルモンや免疫抑制剤は使用せず、拡大胸腺摘出術または、胸腺胸腺腫摘出術を施行した。

開胸手術を受けた、非免疫性疾患患者11名を対照とした。対照例の年齢は3-55歳、平均

29歳であった。

2.リンパ球の抽出方法

手術時得られた胸腺組織をはさみで機械的にときほぐし、Hanksバランス液に浮遊させ、Ficoll-Hypaque液による比重遠心法で、リンパ球を分離した。胸腺腫のある症例については胸腺腫と離れた部分の胸腺を用いた。また、ヘパリン化末梢血でも同様に、Ficoll-Hypaque液を用いて比重遠心法で、リンパ球を分離した。

3.抗AChR抗体価の測定方法

Lindstromの方法(12)で測定した。

大腿部切除患者の大腿部筋肉をミンスし、Tris buffer液に浮遊し、4℃,10,000rpmで1時間遠沈した。ペレットを2% Triton X-100 Tris buffer(2%TritonX-100,0.1M sodium azide, 0.1mM phenylmetyl sulphonyl-fluoride、PH7.0)に浮遊させ、12時間、攪はんし、その後、400,000rpm、1時間遠沈し、上清をAChRを抽出液とした。

AChR抽出液 10ml（3.5pmol）に、^{125}I標識α-bungarotoxin (Amersham)10μCiを添加した。この混合液100μlに患者血清1μlを添加し、4℃で約12時間反応させた。次に、ウサギ抗ヒトIgG抗体 (Hoechst)50μlを添加し、4時間反応させた後、生じた免疫複合体を4mlの1% Triton X-100 Tris buffer液で2回洗浄した。この沈査の^{125}Iをガンマカウンターで測定し、α-bungarotoxinのモル数で血漿のAChR抗体価を表した。

^{125}Iのバックグラウンドは、正常ヒト血漿の沈査のカウント数を用いた。

測定は、それぞれ、triplicateで行い、その平均値を抗体価として表した。

4.Fluoroescein activated cell sorter (FACS)によるリンパ球の表面抗原の分析方法

fluoresein isothiocyanate（FITC）標識抗CD8(Leu 2),抗CD45RA(Leu 18)と、Phycoerythrin(PE)標識抗CD4(Leu 3a),抗CD3(Leu 4)を用いた。何れも、Becton

Dickinson社製のモノクロナール抗体であった。胸腺組織からリンパ球を抽出し、0.5-1.0×10^6個の細胞を100μlの燐酸緩衝液に浮遊し、これにFITC標識モノクロナール抗体とPE標識モノクロナール抗体を各10μlずつ添加した。この混合液を4℃で30分間反応させた後、燐酸緩衝液で2回洗浄した。次に、死細胞を同定、除外するために、propidium iodide(5μg/ml)を加えた後、FACStar(Beckton Dickinson)に用いて解析した。

5.推計学的分析

Student t test,Mann-Whitney's U-test, linear regression および Speaman's rank correlationを用いた。$p<0.05$をもって有意と判定した。

結果

表1に18例のMG患者のCD4/CD8,DR/CD3,CD45RA/CD3の二重染色の結果を示す。

(1)CD4,CD8陽性細胞の割合

表1に示すように、正常胸腺ではCD4+,CD8+のdouble positive cellは1.5-84.7%、平均51.9±27%であった。

MG胸腺内のdouble positive cellの割合は18.7%-82%,平均48.9±19.9%で、正常胸腺と有意差はなかった。CD4+CD8- single positive cellの割合は正常胸腺で平均17.4±16.0%,MGで平均22.6±9.6%、またCD4-CD8+ single positive cellの割合は正常胸腺で平均10.4±6.1%、MG胸腺で平均11.2±6.5%でいずれも有意差を認めなかった。MG胸腺のなかではdouble positive cell, single positive cellともに、胸腺腫合併例と、非合併例との間に有意差を認めなかった(表1)。

(2)年齢とdouble positive cellの割合との関係:

胸腺内リンパ球の中の、double positive cell(CD4+CD8+ cell)の割合と年齢との関係を検討すると、正常胸腺においては、図1のように、年齢とともに、double positive cellの割合が低値となり、両者には有意($r=-0.89$, $p<0.05$)の負の相関性を認めた。

一方、MG症例では、正常胸腺と同様に年齢とともに、double positive cellの割合が低値となる傾向があったが、有意の相関性はなかった(図2)。

(3)血清抗AChR抗体価と胸腺細胞内のCD4,CD8細胞の割合の関係:

MG患者の血清抗AChR抗体価は、図3に示すように、胸腺内double positive cell(CD4+CD8+)の割合と有意($r=-0.52$, $p<0.05$)の負の相関を示した。

また、血清抗体価と、CD4+のsingle positive cellの割合は、図4に示すように、有意($r=0.56$, $p<0.05$)の正相関を示したが、CD8+のsingle positive cell)と抗体価とは有

意の相関性を示さなかった(図5)。

(4)胸腺内B細胞(DR+CD3-)の割合: B細胞の割合は正常胸腺(n=7)では0.1から18.5%に分布し、平均5.0±6.4%であった(表1)。

MG症例では、0.9%-10.8%の間に分布し、胸腺腫非合併例では平均4.8±3.1%、合併例では平均5.6±3.6%と3群間に有意差を認めなかった(表1)。MG患者の血清AChR抗体価と、胸腺細胞内のDR+CD3-細胞の割合との間には有意の相関性はなかった(表1)。

(5)胸腺内CD45RA+陽性T細胞(CD45RA+CD3+)の割合: 成熟した胸腺リンパ球のマーカーのひとつであるCD45RA陽性のT細胞の割合は、正常胸腺(n=4)では1.6から7.1%に分布し、平均3.8±2.4%であった。

胸腺腫非合併例では1.1から26.5%で、平均10.7±7.4%、胸腺腫合併例では6.2から26.2%で、平均10.5±7.7%であった。MG胸腺のCD45RA陽性T細胞の割合は正常胸腺と比較して有意に高値であった($p<0.01$)、(表1)。

血清抗AChR抗体価とCD45RA陽性T細胞の割合との間には、Speaman's rank correlationにより有意（$rs=0.51, p<0.05$）の正相関を認めた（図６）。

考案

ＭＧ患者胸腺のリンパ球は試験管内で抗AChR抗体を産生するという機能的異常が報告されているが(5-8)、著者は、２カラーフローサイトメトリーにより、ＭＧ胸腺のリンパ球サブセットを解析し、そのサブセット分布が、患者血清抗AChR抗体価に影響されていることを明らかにした。

正常胸腺では、CD4+CD8+の double positive cell の割合が年齢とともに低下した（図１）。これは、胸腺が年齢とともに退縮していくことと関連していると思われた。

一方、ＭＧ胸腺では、年齢と double positive cell の割合と間には有意の相関はなく、ばらつきが大きかった（図２）。

今回明らかになった最も注目すべきことは、患者血清抗AChR抗体価と胸腺内のリンパ球サブセットの分布との関連であった。患者血清抗AChR抗体価は胸腺内の double positive cellの割合と負の相関を（図３）、single

positive cell、CD45RA陽性T細胞の割合と正の相関を示した（図4、6）。すなわち、血清抗AChR抗体価の高い患者の胸腺には、single positive cellが多く、double positive cellが少なかった。このことは、血清抗AChR抗体価の高い患者の胸腺には、成熟したリンパ球が多いことを意味している。

成熟した胸腺リンパ球のマーカーのひとつである(13)、CD45RA+CD3+ cellの割合も、患者血清の抗AChR抗体価と有意の相関をした（図6）。

抗体産生のために重要な働きをするのは、single positive cell の中でも、CD4+ のヘルパー細胞である。抗AChR抗体産生においてもヘルパーT細胞が必要であることが明らかになっている(14-16)。著者の成績では血清抗AChR抗体価は胸腺中のCD8+ よりもむしろCD4+ 細胞の割合とより強い相関を示した（図4、5）。このことは、MG胸腺リンパ球のサブセットの異常が、MG胸腺で報告され

ている機能的異常、すなわち胸腺における抗AChR抗体産生と関連している可能性を示唆している。

正常幼児胸腺に多く見られる double positive cell、即ち未熟な胸腺皮質リンパ球は、single positive cell に向かって成熟する段階で、自己抗原に対する寛容を獲得すると考えられている。しかるにMGにおいては血清抗AChR抗体の存在により、自己AChR に反応するリンパ球が存在すると考えられる。抗AChR抗体価の高い例の胸腺リンパ球により試験管内で抗AChR抗体の産生が見られる(5-8)事実と考え合わせると、自己AChR反応性リンパ球は胸腺にも存在していることが示唆される。従って、抗AChR抗体価の高い患者の胸腺内の single positive cell は、単に非特異的な成熟細胞の増加ではなく、その中に自己AChR に反応するリンパ球を含んでいることが示唆された。

（文献）

1)Vincent A. Immunology of acetylcholine receptors in relation to myasthenia gravis.Physiol Rev 60:756-824,1980.

2)Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptors in myasthenia gravis and its animal model. Advances in Immunology 27:1-50,1979.

3)Vincent A,Newsom-Davis J,Newton P, Beck N. Acetylcholine receptor antibody and clinical response to thymectomy in myasthenia gravis. Neurology 33:1276-1982,1983.

4)K.Kagotani,Y.Monden,K.Nakahara, Y.Fujii,Y.Seike,S.Kitamura,A.Masaoka, Y.Kawasima. Anti-acetylcholine receptor antibody titer with extended thymectomy in myasthenia gravis. J Thorac Cardio-vasc Surg 90:7-12,1985.

5)Scadding GK,Vincent A,Newsom-Davis J, Henry K. Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes:Correlation with thymic histology. Neurology 31:935-943,1981.

6)McLachlan SM,Nicholson LVB, Venables G,et al. Acetylcholine receptor antibody synthesis in lymphocyte cultures. J Clin Lab Immunol 5:137-142, 1981.

7)Lisak RP,Laramore C,Levinson AI,et al. In vitro synthesis of antibodies to acetylcholine receptor by thymic lymphocytes from patients with myasthenia gravis. Ann Neurol 14:121,1983.

8)Y.Fujii,Y.Monden,K.Nakahara,
J.Hashimoto,Y.Kawashima. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis:production by lymphocytes from thymus or thymoma. Neurology(Cleveland) 34:1182-1186,1984.

9)Abdou I,Lisak RP,Zweiman B,
Abrahamsohn I,Penn AS. The thymus in myasthenia gravis:evidence for altered cell populations. N Engl J 291:1271-1275,1974.

10)Staber,F.G.,Fink,U.&Sank,W. B lymphocytes in the thymus of patients with myasthenia gravis. N Engl J Med 292: 1032-1033,1975.

11)Piantelli M,Lauriola L,Carbone A,
Evoli A,Tonali P,Musiani P.
Subpopulations of T lymphocytes in myasthenia gravis patients. Clin Exp Immunol.36:85-89,1979.

12)Lindstrom J. An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. Clin Immunol Immunopathol.7:36-43,1977.
13)Serra HM,Krowka JF,Ledbetter JA, Pilarski LM. Loss of CD45R(Lp220) represents a post-thymic differentiation event. J Immunol.140:1435-1441,1988.
14)De Beats,M.,B.Einarson,J.Lindstrom, andW.Weigle. Lymphocyte activation in experimental autoimmune myasthenia gravis. J Immunol.128:2228-2235,1982.
15)Krolick,K.,O.Urso. Analysis of helper Tcell function by acetylcholine receptor reactive cell lines of defined AchR sub-unit specificity. Cell Immunol.105:75-85,1987.

16)Y.Fujii,J.Lindstrom. Regulation of antibody production by helperTcell clones in experimental autoimmune myasthenia gravis. J Immunol.141:3361-3369,1988.

Table 1 Patient Characteristics and the phenotype of thymic lymphocytes

患者	年齢	性別	Osserman 分類	anti-AchR ab (nM)	CD4⁺CD8⁺ (%)	CD4⁺CD8⁻ (%)	CD4⁻CD8⁺ (%)	DR⁺CD3⁻ (%)	CD45RA⁺CD3⁺ (%)
Normal									
1	3	F			84.7	9.1	5.5	3.3	N.D.
2	4	M			69.9	15.4	10.9	N.D.	N.D.
3	6	M			79.5	11.7	7.4	0.7	3.9
4	15	M			62.6	6.0	8.9	0.1	N.D.
5	25	F			65.6	2.9	4.8	N.D.	N.D.
6	26	M			75.1	9.4	11.7	3.3	2.6
7	38	M			28.7	8.7	12.4	N.D.	N.D.
8	45	M			41.2	11.7	5.7	1.6	7.1
9	46	F			46.5	20.2	9.4	7.2	1.6
10	55	M			15.2	52.2	11.1	N.D.	N.D.
11	55	M			1.5	44.2	27.0	18.5	N.D.
	29±20				51.9±27.5	17.4±16.0	10.4±6.1	5.0±6.4	3.8±2.4
MG without thymoma									
1	12	F	IIB	1.6	73.8	12.8	8.7	7.5	4.3
2	13	F	I	0.3	82.0	7.6	6.3	0.9	1.1
3	19	F	IIB	0.4	74.2	15.7	6.5	0.9	4.9
4	20	F	IIB	0.2	62.3	19.9	8.7	2.6	7.8
5	23	F	IIA	18.2	18.7	41.5	14.3	10.5	26.5
6	32	M	IIB	32.0	63.1	19.0	10.9	2.7	9.7
7	35	F	IIA	166.0	39.4	30.2	11.8	5.9	13.6
8	36	F	I	158.0	26.6	28.5	7.1	4.6	N.D.
9	37	F	IIB	194.0	23.7	41.0	11.6	N.D.	N.D.
10	37	F	IIB	4.4	54.7	24.4	6.2	7.2	13.2
11	45	F	IIB	29.9	60.7	14.2	11.1	N.D.	8.5
12	51	M	IIA	31.9	32.1	29.1	8.4	5.5	17.4
	30±12			53.1±73.6	50.9±21.9	23.7±10.8	9.3±2.6	4.8±3.1	10.7±7.4
MG with thymoma									
13	26	M	I	4.7	31.8	15.6	33.1	3.0	6.2
14	39	M	IIA	8.5	57.1	13.1	9.5	2.7	7.3
15	45	F	IIB	3.7	37.3	27.2	20.3	9.3	26.2
16	53	M	IIB	6.5	23.4	25.9	12.6	10.8	6.8
17	53	F	IIA	52.2	58.5	14.2	7.5	5.5	7.8
18	54	M	IIB	152.0	61.5	27.0	7.6	2.4	8.7
	45±11			37.9±58.9	44.9±16.1	20.5±6.9	15.1±10.0	5.6±3.6	10.5±7.7

N.D. : not done

図1 Double Positive Thymocytes in Normal Controls

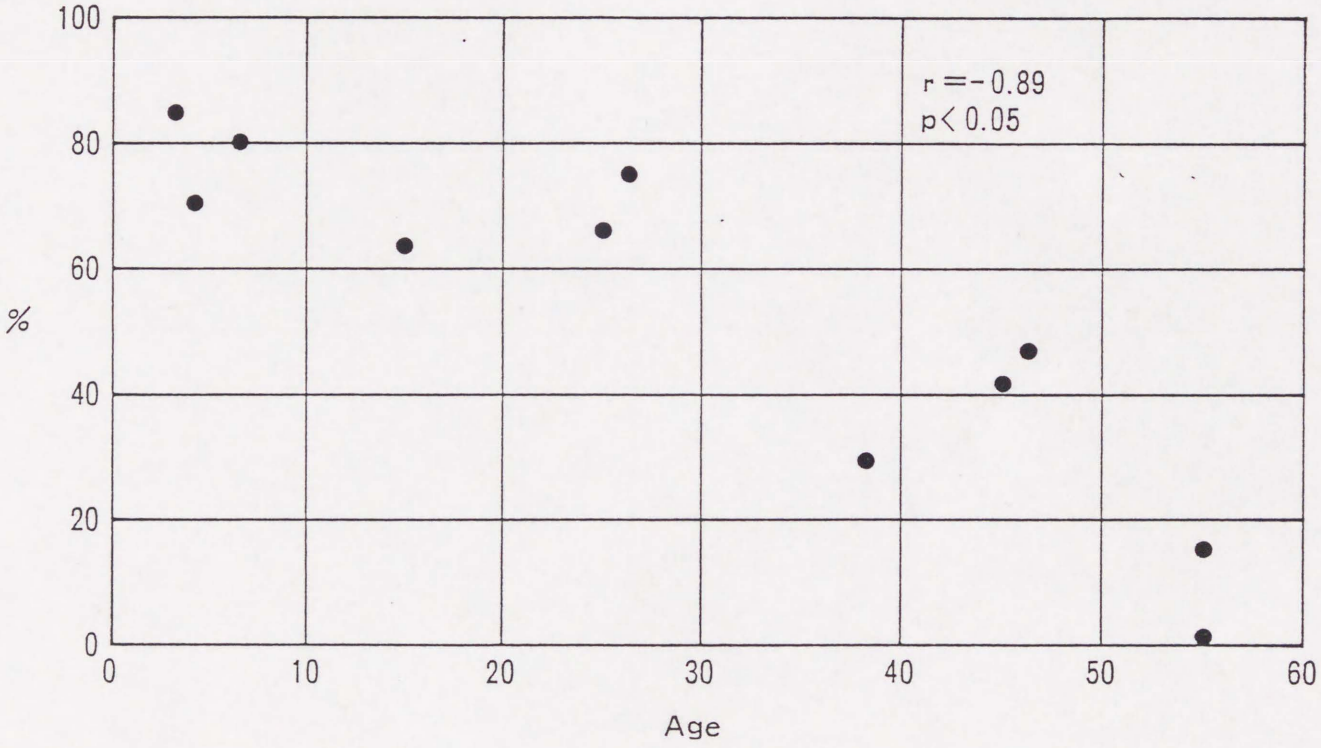

図2 % Double Positive Thymocytes in MG

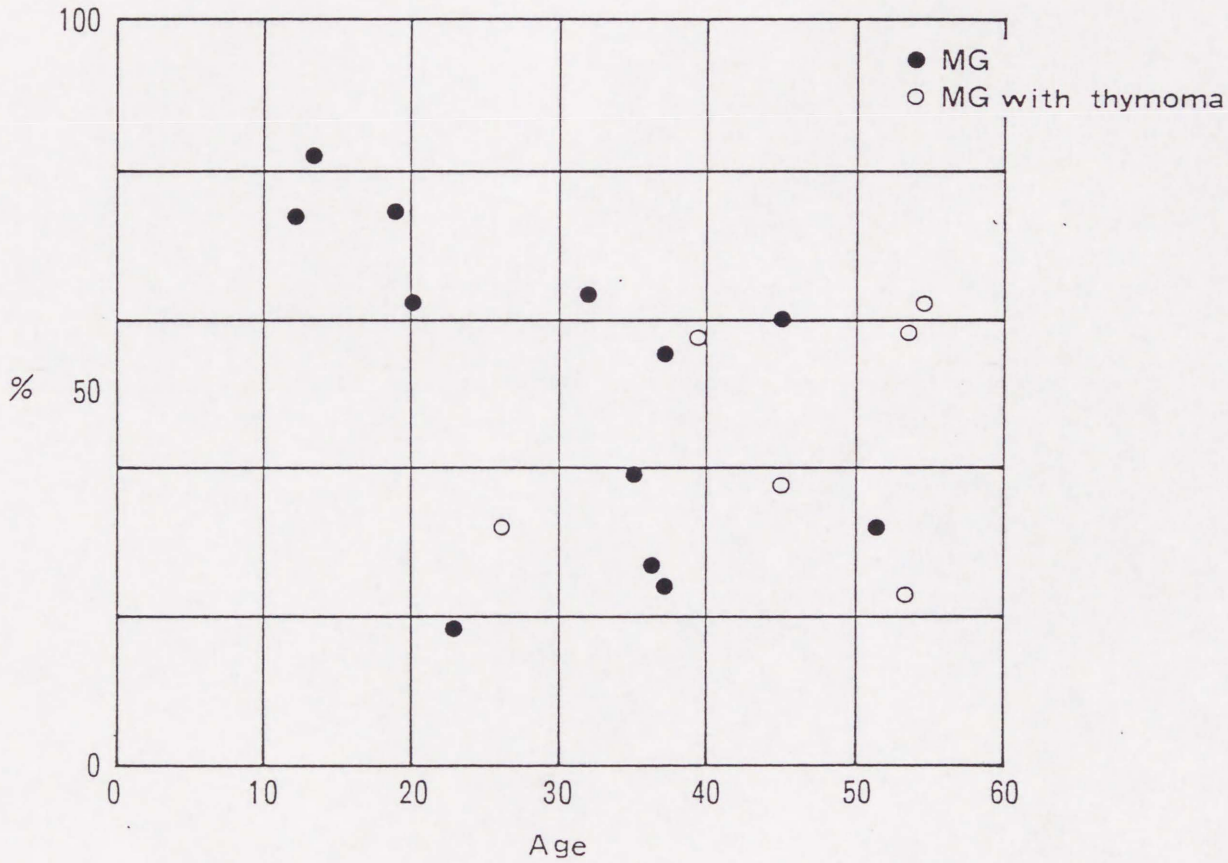

図3 % Double positive cells in relation to anti-AChR antibody titre

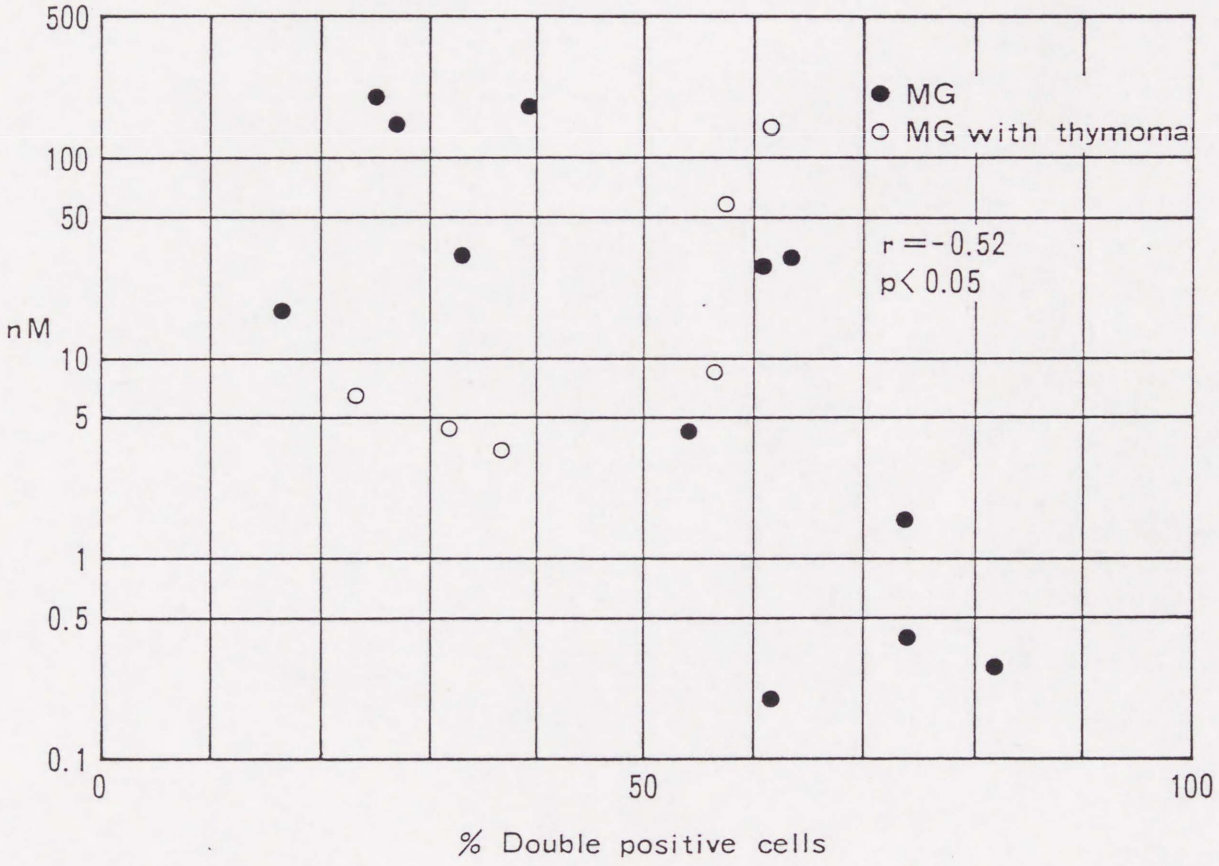

図4 %CD4 single positive cells in relation to anti-AChR antibody titre

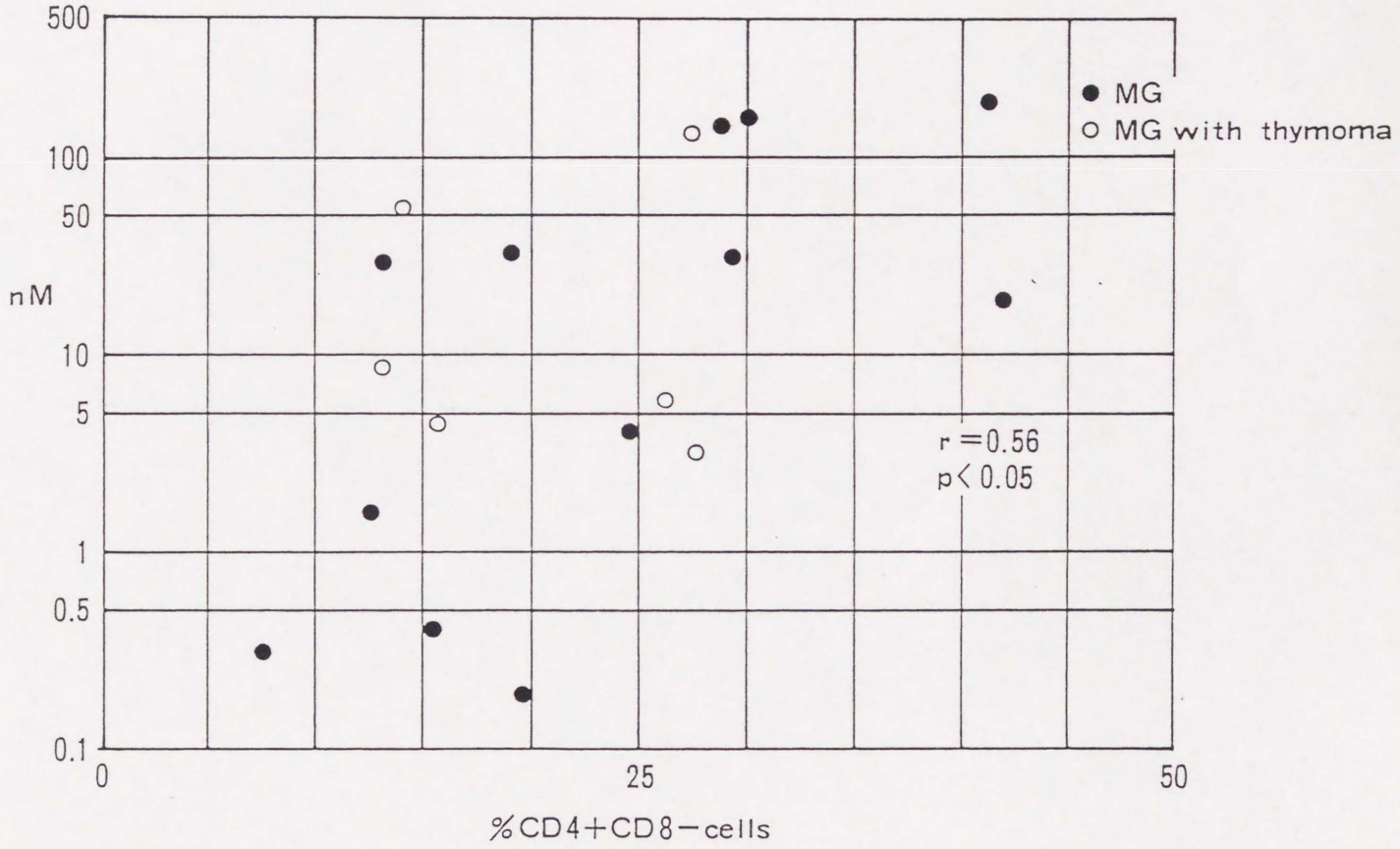

図5 % CD8 single positive cells in relation to anti-AChR antibody titre

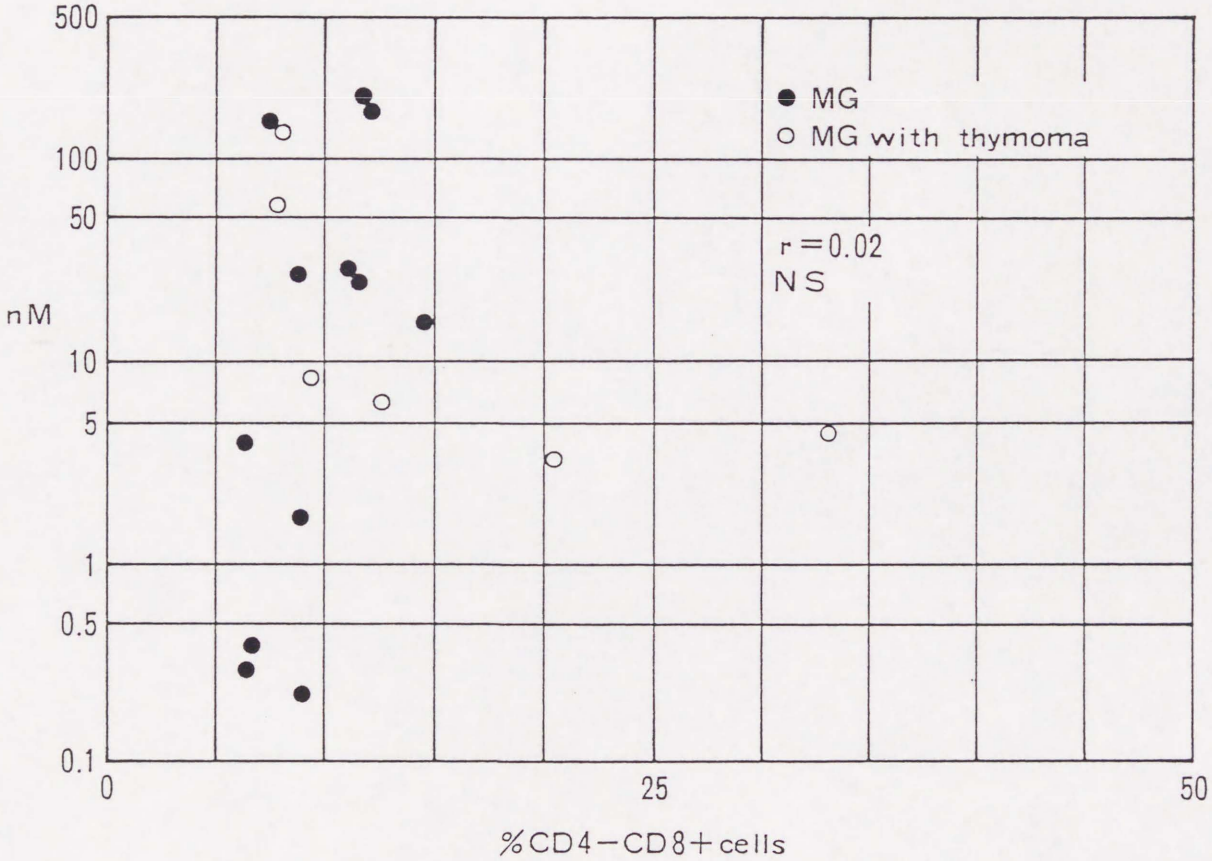
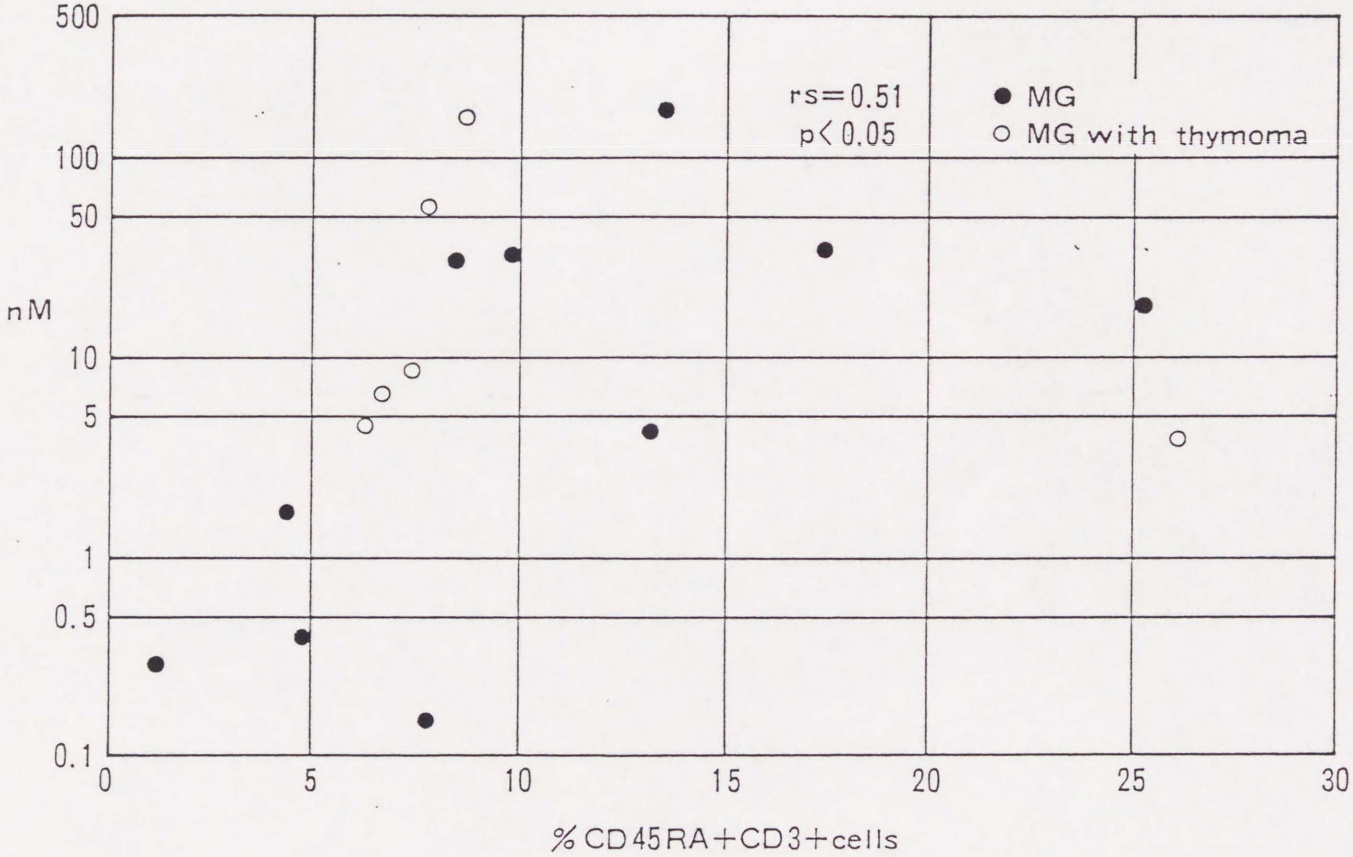
図6 % CD45RA+CD3+ cells in relation to anti-AChR antibody titre